

BEST AVAILABLE COPY

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 2001-286281

(43)Date of publication of application : 16.10.2001

(51)Int.Cl.

C12N 15/09
C12N 1/16
C12Q 1/68
G01N 33/53
G01N 33/566
G01N 33/569
//(C12N 15/09
C12R 1:645)
(C12N 1/16
C12R 1:645)
(C12Q 1/68
C12R 1:645)

(21)Application number : 2000-105907

(71)Applicant : NATL INST OF ADVANCED
INDUSTRIAL SCIENCE &
TECHNOLOGY METI
TERAMETSUKUSU KK

(22)Date of filing : 07.04.2000

(72)Inventor : IWAHASHI HITOSHI
MOMOSE YUKO
KAWAI SHOJI
MATSUMOTO MASAMITSU

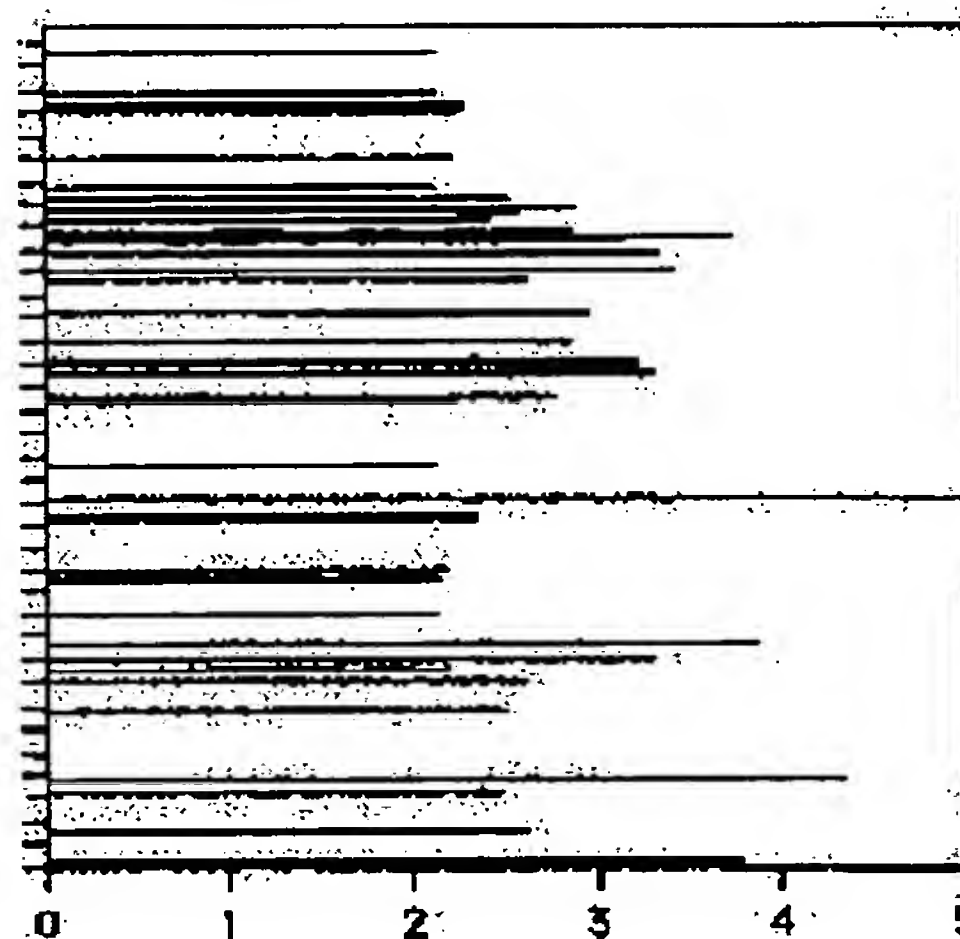
(54) METHOD FOR ASSESSING TOXICITY OF AND METHOD FOR IDENTIFYING CHEMICAL SUBSTANCE

(57)Abstract:

PROBLEM TO BE SOLVED: To provide the subject two methods having resolved such a problem that, conventional bioassays rely on cell growth inhibition or specific biological reaction as index, resulting in limited amount of information to be obtained; in such a bioassay system, although the presence/absence of toxicity due to chemical substance(s) in the environment can be assessed, neither information concerning such toxicity's characteristics nor information for judging what kind of chemical substance(s) has(have) caused the toxicity is available.

SOLUTION: The two methods, i.e., a method for assessing the toxicity of and a method for identifying chemical substance(s) in question, comprise culturing cells in the presence of chemical substance(s) to be assessed and simultaneously observing the expressed state for the genes in the above cells.

塩化カドミウム(0.33mM)



LEGAL STATUS

[Date of request for examination]

09.01.2003

[Date of sending the examiner's decision of rejection]

[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number]

[Date of registration]

[Number of appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of requesting appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of extinction of right]

*** NOTICES ***

JPO and NCIP are not responsible for any damages caused by the use of this translation.

1. This document has been translated by computer. So the translation may not reflect the original precisely.
2. **** shows the word which can not be translated.
3. In the drawings, any words are not translated.

CLAIMS

[Claim(s)]

[Claim 1] The toxic evaluation approach of the chemical characterized by cultivating a cell under existence of the chemical which should be evaluated and observing two or more gene expression conditions of this cell to coincidence.

[Claim 2] The toxic evaluation approach of the chemical according to claim 1 chosen from the gene cluster as which at least one of these genes is specified in Table 9, or this and a homologous gene cluster.

[Claim 3] The toxic evaluation approach of the chemical according to claim 2 which is a thing using a DNA microarray or a macro array.

[Claim 4] The toxic evaluation approach of a chemical according to claim 1, 2, or 3 that this cell is a microorganism.

[Claim 5] The toxic evaluation approach of a chemical according to claim 4 that this microorganism is yeast.

[Claim 6] Evaluation of this manifestation condition cultivates a cell in the condition that this chemical does not exist on the same conditions as the culture under existence of this chemical. The complementary DNA from the gene at the time of the culture under existence of this chemical (cDNA), The toxic evaluation approach of the chemical according to claim 3, 4, or 5 which is what is performed by applying both cDNA(s) from the gene in the condition of not existing to the same DNA chip, and detecting the difference of the hybridization by the competitive reaction.

[Claim 7] The identification approach of the chemical characterized by identifying the matter in measured liquid by cultivating a cell under existence of a known chemical, memorizing the gene expression condition of this cell as a standard pattern, cultivating the same cell under existence of measured liquid, and comparing the gene expression condition at that time with a standard pattern.

[Claim 8] The identification approach of the chemical according to claim 7 chosen from the gene cluster as which at least one of these genes is specified in Table 9, or this and a homologous gene cluster.

[Claim 9] The identification approach of the chemical according to claim 8 which is a thing using a DNA microarray or a macro array.

[Claim 10] The identification approach of a chemical according to claim 7, 8, or 9 that this cell is a microorganism.

[Claim 11] The identification approach of a chemical according to claim 10 that this microorganism is yeast.

[Claim 12] Evaluation of this manifestation condition cultivates a cell in the condition that this chemical does not exist on the same conditions as the culture under existence of this chemical. The complementary DNA from the gene at the time of the culture under existence of this chemical (cDNA), The identification approach of the chemical according to claim 9, 10, or 11 which is what is performed by applying both cDNA(s) from the gene in the

condition of not existing to the same DNA chip, and detecting the difference of the hybridization by the competitive reaction.

[Translation done.]

*** NOTICES ***

JPO and NCIP are not responsible for any damages caused by the use of this translation.

1. This document has been translated by computer. So the translation may not reflect the original precisely.
2. **** shows the word which can not be translated.
3. In the drawings, any words are not translated.

DETAILED DESCRIPTION

[Detailed Description of the Invention]

[0001]

[Field of the Invention] This invention relates to the toxic appraisal method and method of identification of a chemical.

[0002]

[Description of the Prior Art] Current, data base of a chemical The chemical of about 17 million affairs is registered into Chemical abstract. Among those, what 10,000 or more kinds of synthetic chemistry matter is accumulating into an environment is presumed, and the number is increasing every year. Direct in synthetic material After changing a form in ** or an environment, the matter which has a bad influence on ecology or the body is also contained. Therefore, it is necessary to evaluate quickly the effect which it has on ecology or the body about each chemical. Moreover, the attempt which is going to identify the chemical which exists in an environment with various advanced gaging systems is made under the situation of being the social problem which an environmental pollution problem instigates national anxiety.

[0003] Furthermore, toxic index-ization by the simple toxicity evaluation trial using a bioassay is made in many engines. This measures "change of the living thing-response by the chemical" using an animals-and-plants cell or a microorganism, and evaluates "toxicity."

[0004]

[Problem(s) to be Solved by the Invention] However, no matter advanced technique [what] it may use, in the present condition, it is said that about 10% of chemical can be identified. Therefore, the method of identifying simply the chemical which exists in an environment was demanded. Furthermore, the conventional bioassay mainly makes the index the growth inhibition and the specific vital reaction of a cell, and the amount of information is restricted. By such bioassay system The information for judging the toxic property and what kind of toxic chemical although the toxic existence by the chemical in an environment can be evaluated, it is the toxicity resulting from is not acquired at all.

[0005]

[Means for Solving the Problem] The place by which this invention person used to make complete this invention wholeheartedly in view of the above present condition as a result of research, and it is characterized [the] In the toxic appraisal method of a chemical, a cell is cultivated under existence of the chemical which should be evaluated. If it is in the point which observes two or more gene expression conditions of this cell to coincidence, and is evaluated and is in the identification approach of a chemical It is in the point of identifying

the matter in measured liquid, by cultivating a cell under existence of a known chemical, memorizing the gene expression condition of this cell as a standard pattern, cultivating the same cell under existence of measured liquid, and comparing the gene expression condition at that time with a standard pattern.

[0006] The chemical has the toxicity of a proper, respectively and affects a living thing. The influenced living thing uses restoration or a detoxication device according to the toxicity. There are some which are called a stress response as the example. From a microorganism to a higher organism, if all living thing cells are put to environmental stress (an elevated temperature, low temperature, high pressure, desiccation, ultraviolet rays, drug exposure, etc.), stress response protein (HSP) will be compounded in an instant, and the organization which bears these environments will be prepared. This is called stress response. That is, moreover, a stress response protein production gene is produced according to extent of the stress which received the protein according to the class of stress, only when a living body is influenced of environmental. If it returns, the living body will have discovered the stress response protein production gene according to the class and extent of stress. That is, it becomes possible to evaluate the toxicity of the chemical by detecting the specific gene expression brought about by induction of the repair mechanism from the effect of toxic, or a detoxication device which the living body received from the chemical.

[0007] The effect of a chemical does not only bring about one gene expression, and two or more genes answer toxicity and always discover it. Moreover, the class of gene to discover and a manifestation pattern change with chemicals. This invention can identify the class of strange chemical, and toxic extent using this. That is, the chemical can be presumed because this strange chemical compares the spectrum (pattern) of the gene cluster guided characteristic and the gene cluster guided using a known chemical. Moreover, it can presume whether there is any danger that a strange chemical is how much, from the gene cluster guided.

[0008] The chemical which should be evaluated is a chemical contained in sample liquid, and it does not need to understand some, and it is not necessary to understand more than one in an unit. Therefore, the bottom of existence of the chemical here which should be evaluated is the semantics of the bottom of existence of the sample liquid in which the chemical is contained.

[0009] With a chemical here, a copper sulfate, a mercury chloride, a potassium dichromate, Inorganic metallic compounds, such as a lead chloride, a nickel chloride, and a cadmium chloride, a tributyltin chloride, Organochlorine compounds, such as organometallic compounds, such as methylmercury and a tetramethyl lead, a dichloroethane, and dioxin, Although alcohols, such as surfactants, such as agricultural chemicals, such as organic compounds, such as bisphenol A and a dimethyl phthalate, sulfanil urea, an organic phosphorous compound, and a carver mate agent, and sodium dodecylbenzenesulfonate, and a methanol, etc. are raised What is necessary is just not the thing to limit to these but the chemical which has bioactive at least.

[0010] Moreover, this invention can also evaluate the toxicity of a new chemical entity. If the gene cluster guided about a new chemical entity is measured and the manifestation pattern is memorized, existence of the chemical concerned in a strange sample can be checked. A presentation or structure of a chemical do not need to be known at this time. Moreover, examining the manifestation gene in a detail can estimate the toxicity, and it is **. For example, as an example 1 shows, it can presume that lack of a glutathione, a cysteine, and a methionine takes place from the gene cluster guided from cadmium at least, but if these genes are discovered in a new chemical entity, it can evaluate that the matter has the toxicity of cadmium resemblance.

[0011] Although a human cell is naturally desirable as a cell, the cell of a mouse and others is sufficient. Furthermore, since culture being easy and the function of a gene are often studied, it is also suitable to use a microorganism as a cell. Moreover, yeast was suitable also in the

microorganism. This is because it is considered the living thing in the process of Homo sapiens evolution and it is thought that there are many genes which function as the toxicity to Homo sapiens etc. similarly the top where handling is easy.

[0012] The culture approach does not need to be a good special approach by the usual culture approach of the cell to be used. It is good at a YPD culture medium or other culture media.

[0013] As a means to observe a gene expression condition and to evaluate, as long as it is the approach of measuring the amount of gene expression to perform two or more Northern blots and RTPCR(s) etc., what kind of approach is sufficient as it. However, the approach using a DNA microarray or a macro array is suitable. With a DNA microarray, several ten to about thousands of pieces or tens of thousands of cDNA(s) (complementary DNA) are stuck on a small chip like slide glass (about 25mmx75mm). On the other hand, with a macro array, dozens to about thousands of cDNA(s) are similarly stuck on the support (about 10cmx10cm) of the shape of a comparatively big filter paper.

[0014] DNA or RNA discovered from the sample is taken out, and it amplifies suitably using PCR etc. as occasion demands, and adds to an array (application). DNA in a sample and cDNA on an array are made to hybridize by adjusting temperature suitably. Although detection of hybridized DNA is usually detected using markers, such as a fluorochrome, not using a marker, the detecting method using surface plasmon resonance, depolarization or EBANESSENTO light, etc. can also be used.

[0015] By the above-mentioned observation approach, although the sample is detected independently, except not adding a chemical (sample solution containing this), also create the control plot (blank specimen) cultivated on the same conditions as a sample, apply it and a sample specimen to a DNA array together, hybridization is made to start competitively, and the difference in the amount of hybridization of the sample in the same gene and a blank specimen may be observed.

[0016] DNA installed to the array identifies the target chemical -- being required . For example, although it is said in yeast that there are about 6000 genes, it is presumed that the gene from which a chemical is answered and the amount of manifestations changes specifically is at most about 500 pieces. A part of genes answered and discovered to poison in Table 9 were enumerated. Although the judgment of eight kinds of compounds which are only these genes and were shown in the example at least is possible, a compound is not limited to these.

[Table 9]

発現する遺伝子の一部

YAL012W	YCR021C	YER103w	YHL015W	YJR047C	YLR231C	YNL178W	YOR259C
YAL019W	YCR031C	YER138c	YHL023C	YJR132W	YLR257W	YNL190W	YOR266W
YAL067C	YCR062W	YER150w	YHR019C	YJR155W	YLR270W	YNL191W	YOR293W
YAR002W	YCR085W	YFL014W	YHR053C	YJR157W	YLR280C	YNL208W	YOR303W
YAR007C	YCR096C	YFL057C	YHR055C	YKL001C	YLR282C	YNL209W	YOR306C
YAR043C	YCR097wa	YFR016C	YHR056C	YKL006W	YLR286C	YNL214W	YOR310C
YBL006C	YDL061C	YFR022W	YHR073W	YKL026C	YLR300W	YNL239W	YOR338W
YBL046W	YDL078C	YFR031BC	YHR087W	YKL060C	YLR303W	YNL277W	YOR355W
YBL069W	YDL081C	YFR043C	YHR092C	YKL071W	YLR327C	YNL281W	YOR369C
YBL073W	YDL089W	YFR049W	YHR094C	YKL097W	YLR337W	YNL302C	YOR371C
YBL077W	YDL109c	YFR052W	YHR096C	YKL136W	YLR340W	YNL307C	YOR375C
YBR012W-B	YDL181W	YGL014W	YHR104W	YKL143W	YLR354C	YNL331C	YOR382W
YBR027C	YDL204w	YGL030W	YHR138C	YKL181W	YLR359W	YNL334C	YPL028W
YBR031W	YDR032c	YGL037C	YHR140W	YKL200C	YLR367W	YNR001C	YPL037C
YBR071W	YDR033w	YGL053W	YHR174W	YKL214C	YLR388W	YNR021W	YPL053C
YBR072W	YDR069C	YGL055W	YHR203C	YKL217W	YML004C	YNR030W	YPL079W
YBR077C	YDR070c	YGL103W	YIL010W	YKR032W	YML102W	YOL006C	YPL081W
YBR078W	YDR077W	YGL116W	YIL020C	YKR039W	YML106W	YOL016C	YPL090C
YBR082C	YDR154C	YGL121C	YIL021W	YKR042W	YMR009W	YOL038W	YPL106C
YBR094W	YDR223W	YGL135W	YIL074W	YKR051W	YMR011W	YOL044W	YPL147W
YBR149W	YDR225W	YGL138C	YIL082W	YKR057W	YMR015C	YOL049W	YPL149W
YBR163W	YDR227W	YGL146C	YIL090W	YKR059W	YMR052W	YOL053C	YPL194W
YBR162C	YDR335W	YGL147C	YIL100W	YKR080W	YMR058W	YOL056W	YPL201C
YBR167C	YDR342C	YGL239C	YIL106W	YKR094C	YMR107W	YOL086C	YPL221W
YBR169C	YDR343C	YGL240W	YIL111W	YLL024c	YMR167W	YOL127W	YPL239W
YBR173C	YDR345C	YGR008C	YIL136W	YLL039c	YMR173W	YOL141W	YPL250C
YBR181C	YDR385W	YGR039W	YIL144W	YLL058W	YMR215W	YOL151W	YPR006C
YBR191W	YDR443C	YGR040W	YIR012W	YLR029c	YMR243C	YOL164W	YPR023C
YBR196C	YDR453C	YGR043C	YJL062W	YLR056w	YMR275C	YORJ007C	YPR082C
YBR207W	YDR475C	YGR087C	YJL083W	YLR058c	YMR301C	YOR019W	YPR099C
YBR221C	YDR491C	YGR088W	YJL110C	YLR081w	YMR307W	YOR020C	YPR119W
YBR236C	YDR533C	YGR103W	YJL116C	YLR092W	YMR318C	YOR027W	YPR125W
YBR257W	YBL006w	YGR142W	YJL144W	YLR110C	YNL015W	YOR081C	YPR159W
YBR263W	YER012w	YGR154C	YJL151C	YLR118C	YNL055C	YOR088W	YPR165W
YBR296C	YER021W	YGR163W	YJL158C	YLR134w	YNL068W	YOR128C	YPR167C
YCL025C	YER042w	YGR205W	YJL159W	YLR153c	YNL069C	YOR136W	YPR188C
YCL043C	YER046w	YGR224W	YJL160C	YLR157C	YNL134C	YOR152C	YPR204W
YCL056C	YER067w	YGR236C	YJL177W	YLR167W	YNL135C	YOR184W	
YCLX11W	YER072w	YGR246C	YJR009C	YLR178C	YNL142W	YOR187W	
YCR004C	YER074w	YGR253C	YJR010W	YLR205C	YNL143C	YOR221C	
YCR012W	YER091c	YGR254W	YJR025C	YLR214W	YNL160W	YOR240W	
YCR013C	YER102w	YGR275W	YJR029W	YLR216C	YNL169C	YOR253W	

[0017] Only the gene of the high order predetermined number of these amounts of gene expression that choose a specific chemical like eight sorts and are discovered by them may be measured and evaluated. For example, it is measuring only the gene of 50 high orders etc. Measurement will become easy if it does in this way.

[0018] Next, the chemical method of identification of this invention is explained. First, the sample containing a known chemical (a single is desirable) is cultivated, and the gene name and manifestation reinforcement which were discovered are recorded as a criterion of the compound. If these are graph-ized at this time and it memorizes as a pattern, also visually, it can judge. Of course, it may record on a computer and you may judge there.

[0019] When two or more chemicals were contained in sample liquid at this time, it turned out that a gene expression pattern becomes the simple sum total of each manifestation pattern of that chemical contained. Therefore, two or more of the chemicals can be easily presumed from the characteristic amount of gene expression. Of course, a strange chemical cannot be identified in this case. Therefore, the numerousness of the chemicals which how the manifestation pattern of many known chemicals is recorded and saved can identify will be decided. However, the semantics or the function of the gene itself do not need to be known.

[0020]

[Example] Although invention is concretely explained to a detail in accordance with an example below, this invention is not limited to these.

Yeast was cultivated using the example 1 YPD culture medium (1% of yeast extracts, poly peptone 2%, 2% of grape sugars). a logarithm -- the cadmium chloride (CdCl_2 , 0.33mM) was added as a chemical, and it cultivated for 2 hours at the increment term. What added and cultivated the chemical on the completely same conditions as this was made into the control plot. this sample and control plot -- a tales-doses DNA chip (made in a DNA chip lab) -- being dropped -- 65 degrees C -- one evening -- or it was made to hybridize for 12 hours or more The manifestation gene and the amount of manifestations were measured for the DNA chip with the scanner (SCAN-ARRAY4000:GSI RUMIKOSU). It is shown in Table 10.

Although it was also possible to have described all genes, since it was aimed at the gene which answered by the toxicity of a chemical here, about each modeling study matter, only the gene of the high order 50 with many amounts of manifestations was chosen mechanically, and was shown. The relative amount to a control plot shows the numeric value here. That is, when a numeric value is 1, it is tales doses, and I hear that the sample and the control plot are not specially discovered with a chemical, and there are. It may be made to color the approach of this comparison in a different color (fluorescence), it may measure that color, and may perform it.

[0021] Of course, it applies to the same DNA chip, and it may not be made to compete, but it may apply to another DNA chip, and the difference may be measured.

[0022] These tables 10 and 11 also described the role (function) of the gene guided with a cadmium chloride. A sulphuric metabolic system enzyme group can be mentioned as a description of the gene cluster guided. This shows that the abnormalities of sulfur metabolism arose in intracellular [of yeast] by addition of cadmium. Moreover, the amino acid intracellular taking-in-related gene is guided. If the final product of sulfur metabolism considers that they are a glutathione, a cysteine, and a methionine, it can be concluded that the abnormalities which arose by yeast intracellular are lack of these sulfur containing amino acid.

[Table 10]

カドミウムによって誘導される遺伝子-1

遺伝子名	発現強度	遺伝子の機能 (unは未知の遺伝子)
YLR303W	16.52826667	O-Acetylhomoserine-O-Acetyl serine Sulfhydrylase
YKLO01C	10.95636	adenylylsulfate kinase
YOL164W	7.11974	un (unknown)
YIL074W	5.452856667	
YBR296C	4.361473333	Probable Na ⁺ /Pi symporter
YFL057C	3.90936	very similar to A55449 aryl-alcohol dehydrogenase
YAL067C	3.76404	Suppressor of Sulfoxide Ethionine resistance
YNL142W	3.74786	Ammonia transport protein
YCL025C	3.471056667	Amino acid permease
YMR173W	3.415143383	DNA damage inducible;
YMR318C	3.35437	un
YER074w	3.333333333	40S ribosomal protein S24A
YLL058W	3.296736667	un
YLR092W	3.217813333	high affinity sulfate permease
YNL134C	3.160216667	un
YKL217W	3.097286667	essential for lactate uptake in yeast
YOR382W	3.074303333	un
YLR327C	2.93819	un
YNL277W	2.900126667	homoserine O-trans-acetylase
YNL160W	2.871143333	may be involved in cellular adaptations prior to stationary
YLR205C	2.838356667	un
YKR039W	2.76581	general amino acid permease
YDR533C	2.632056667	un
YBR072W	2.615956667	heat shock protein 26
YMR058W	2.613936667	high-affinity iron transport system
YNL239W	2.581933333	aminopeptidase of cysteine protease family

[Table 11]

カドミウムによって誘導される遺伝子-2

遺伝子名	発現強度	遺伝子の機能 (unは未知の遺伝子)
YNL331C	2.513673333	Hypothetical aryl-alcohol dehydrogenase
YDR223W	2.50132	un
YBR207W	2.481336667	
YNL191W	2.430063333	un
YAL012W	2.408388333	cystathionine gamma-lyase
YHR138C	2.345876667	un
YFL014W	2.303206667	12 kDa heat shock protein
YOR253W	2.287533333	un
YOR338W	2.28119	un
YOR303W	2.26205	Carbamoyl phosphate synthetase, arginine specific
YOR306C	2.242523333	un
YKR032W	2.22148	un
YOR007C	2.22148	small glutamine-rich tetratricopeptide repeat containing protein
YPR204W	2.192553333	un
YER046W	2.189143333	un
YGR154C	2.187783383	un
YGR087C	2.157476667	un
YNL208W	2.149786667	un
YJL151C	2.13153	un
YOR375C	2.13153	NADP-specific glutamate dehydrogenase
YOL006C	2.121983333	topoisomerase I
YGR103W	2.116846667	un
YGL055W	2.116823333	delta-9-fatty acid desaturase
YPR023C	2.11356	un

[0023] Next, the same experiment was conducted to various chemicals. The gene name and amount of manifestations are shown in a table. As a chemical, they are methylmercury (CH₃HgCl), a mercury chloride (HgCl₂), TORIBUCHI rutin chloride (C₄H₉) (3SnCl), a potassium dichromate (K₂Cr₂O₇), a nickel chloride (NiCl₂), a copper sulfate (CuSO₄and5H₂O), and a lead chloride (PbCl₂). In addition to these matter, it is shown in Tables 1-8 also including said cadmium chloride. All the genes (it is a limitation to a high order 50) guided were shown in the alphabetical order. Although the number of the genes shown in Tables 1-8 was 400, since there was an overlapping gene, it is a total of 331 kinds, and this was enumerated to Table 9.

[Table 1]

塩化カドミウム (CdCl₂)

遺伝子名	発現量	遺伝子名	発現量
YLR303W	16.53	YNL239W	2.582
YKL001C	10.96	YNL331C	2.514
YOL164W	7.12	YDR223W	2.501
YIL074W	5.453	YBR207W	2.481
YBR296C	4.361	YNL191W	2.43
YFL057C	3.909	YAL012W	2.408
YAL067C	3.764	YHR138C	2.346
YNL142W	3.748	YFL014W	2.303
YCL025C	3.471	YOR253W	2.288
YMR173W	3.415	YOR338W	2.281
YMR318C	3.354	YOR303W	2.262
YER074W	3.333	YOR306C	2.243
YLL058W	3.297	TKR032W	2.221
YLR092W	3.218	YOR007C	2.221
YNL134C	3.16	YPR204W	2.193
YKL217W	3.097	YER046W	2.189
YOR382W	3.074	YGR154C	2.188
YLR327C	2.938	YGR087C	2.157
YNL277W	2.9	YNL208W	2.15
YNL160W	2.871	YJL151C	2.132
YLR205C	2.838	YOR375C	2.132
YKR039W	2.766	YOL006C	2.122
YDR533C	2.632	YGR103W	2.117
YBR072W	2.616	YGL055W	2.117
YMR058W	2.614	YPR023C	2.114

[Table 2]

メチル水銀 (CH₃HgCl)

遺伝子名	発現量	遺伝子名	発現量
YLR214W	5.327	YJR157W	2.127
YJR009C	4.656	YOR136W	2.08
YLR286C	3.95	YNL066W	2.071
YCR013C	3.401	YLR354C	2.061
YMR307W	2.951	YOR187W	2.027
YLR300W	2.782	YOR128C	1.993
YLR359W	2.746	YJL159W	1.992
YMR058W	2.694	YBR031W	1.989
YOR184W	2.693	YLR340W	1.986
YPL028W	2.663	YLR056W	1.978
YMR015C	2.647	YDR033W	1.966
YOL086C	2.552	YJR047C	1.922
YBR078W	2.541	YOR355W	1.916
YNL069C	2.484	YCL043C	1.884
YNL190W	2.435	YLR058C	1.872
YKR080W	2.411	YJL062W	1.858
YLR303W	2.387	YLR153C	1.793
YHR019C	2.364	YML106W	1.793
YLL024C	2.277	YDL109C	1.786
YMR243C	2.233	YCR012W	1.707
YHR174W	2.215	YMR215W	1.697
YLR029C	2.163	YNL307C	1.695
YBR162C	2.159	YNR021W	1.677
YNL209W	2.135	YLR231C	1.675
YPL037C	2.135	YJL158C	1.675

[Table 3]

塩化水銀 (HgCl₂)

遺伝子名	発現量	遺伝子名	発現量
YJR010W	4.993	YDR032C	2.602
YER091C	4.667	YBR149W	2.514
YMR052W	3.935	YCR013C	2.511
YHR087W	3.688	YGL138C	2.479
YNL160W	3.439	YGL116W	2.454
YOL141W	3.427	YKR051W	2.419
YPR167C	3.364	YKL200C	2.416
YER103W	3.318	YLL024C	2.399
YCLX11W	3.315	YGL037C	2.384
YNL134C	3.289	YER150W	2.383
YFLO14W	3.288	YBR169C	2.38
YGR142W	3.157	YMR173W	2.341
YJL160C	3.087	YBR082C	2.303
YLR216C	3.055	YML004C	2.288
YCR012W	3.047	YKL071W	2.288
YGL146C	2.975	YHR056C	2.27
YDR227W	2.9	YLR178C	2.269
YOL151W	2.885	YPL106C	2.261
YNL015W	2.875	YNL281W	2.237
YGR040W	2.748	YLR303W	2.224
YDL204W	2.719	YPL250C	2.21
YOR027W	2.714	YLR270W	2.167
YGR043C	2.654	YGR088W	2.157
YER042W	2.621	YHR104W	2.15
YDR453C	2.603	YML102W	2.145

[Table 4]

トリブチルチンクロライド ((C₄H₉)₃SnCl)

遺伝子名	発現量	遺伝子名	発現量
YKL214C	3.886	YOL053C	1.674
YGR253C	3.434	YKL026C	1.669
YLR327C	3.105	YHR087W	1.66
YIL111W	3.062	YGR275W	1.654
YDR070C	2.918	YJR155W	1.647
YDR533C	2.672	YOR027W	1.644
YFL014W	2.64	YER012W	1.64
YNR030W	2.479	YDR475C	1.639
YGR163W	2.329	YOR019W	1.601
YFL057C	2.328	YFR052W	1.601
YGL121C	2.31	YOR338W	1.597
YNL134C	2.087	YHR138C	1.597
YOR020C	2.039	YCR062W	1.567
YGL053W	2.027	YLR157C	1.564
YOR088W	1.965	YGR236C	1.554
YER150W	1.909	YMR107W	1.554
YOL038W	1.833	YGR224W	1.545
YOR152C	1.827	YGR205W	1.538
YGR008C	1.797	YBR236C	1.534
YOR259C	1.764	YPL053C	1.527
YNL160W	1.728	YCR096C	1.524
YIL144W	1.718	YMR009W	1.513
YPL149W	1.702	YMR167W	1.511
YKL136W	1.687	YIL136W	1.51
YJL114W	1.685	YBR173C	1.507

[Table 5]

重クロム酸カリウム (K₂Cr₂O₇)

遺伝子名	発現量	遺伝子名	発現量
YOR081C	25.25	YDR335W	0.998
YLR337W	5.79	YNL135C	0.994
YJR009C	2.758	YFR016C	0.984
YDR032C	2.679	YOL044W	0.978
YMR275C	2.528	YFR022W	0.962
YOR371C	1.993	YKL143W	0.957
YAR007C	1.641	YLR340W	0.954
YOR221C	1.584	YDL181W	0.95
YJL159W	1.396	YOL049W	0.94
YCR013C	1.383	YDL061C	0.933
YGL030W	1.308	YOR240W	0.929
YBL006C	1.308	YJL177W	0.923
YLR388W	1.291	YLR214W	0.921
YOL086C	1.261	YNL134C	0.907
YLL024C	1.253	YLR134W	0.899
YPL147W	1.246	YLR303W	0.895
YDR077W	1.206	YOR136W	0.889
YPL221W	1.164	YBR078W	0.883
YDR069C	1.119	YHR073W	0.878
YLR110C	1.118	YJR155W	0.865
YDR154C	1.098	YOR259C	0.856
YAL019W	1.085	YBR027C	0.853
YHR174W	1.053	YNL208W	0.848
YNL178W	1.047	YDR533C	0.844
YCR031C	1.047	YNL143C	0.836

[Table 6]

塩化ニッケル (NiCl₂)

遺伝子名	発現量	遺伝子	発現量
YNL160W	19.02	YOL016C	7.572
YJR009C	18.78	YOR266W	7.521
YBR012W	15.72	YMR307W	7.453
YKR059W	13.21	YIL090W	7.193
YJEO29W	11.61	YOL127W	7.193
YMR058W	11.2	YPL239W	7.105
YPL028W	10.4	YCL043C	6.988
YJEO25C	10.05	YEL006W	6.975
YDR077W	10.04	YGR246C	6.892
YHR055C	9.485	YCL025C	6.82
YBR162C	9.369	YLR056W	6.82
YLR354C	9.323	YER067W	6.789
YNL135C	9.206	YBR078W	6.66
YKR094C	9.187	YHL023C	6.578
YJL151C	9.148	YFR049W	6.521
YMR173W	8.996	YLR300W	6.29
YJL159W	8.916	YDL078C	6.29
YGL121C	8.561	YGL030W	6.286
YJL110C	8.319	YLR367W	6.224
YCR021C	8.314	YNR001C	6.221
YLR359W	8.142	YGL135W	6.136
YLL039C	8.024	YGL014W	6.102
YCR013C	7.886	YER138C	6.071
YBR263W	7.696	YKR042W	6.026
YLR257W	7.67	YOR310C	6.01

[Table 7]

硫酸銅 (CuSO₄ · 5H₂O)

遺伝子名	発現量	遺伝子名	発現量
YHR053C	13.97	YIL106W	6.134
YNL169C	11.98	YPR099C	6.121
YPR082C	9.876	YPR188C	6.076
YPR167C	8.821	YNL214W	6.073
YDR443C	8.642	YBL077W	6.071
YHR055C	8.568	YIL021W	6.036
YPR165W	8.447	YBR072W	5.902
YPR006C	8.171	YPL201C	5.779
YIL010W	7.728	YBL073W	5.764
YAR002W	7.721	YBR153W	5.757
YIL082W	7.433	YGL239C	5.645
YGL240W	7.365	YLR280C	5.613
YLL058W	7.265	YCR004C	5.575
YCR085W	7.09	YNL334C	5.553
YIL100W	7.067	YBL046W	5.522
YBR077C	6.986	YAR043C	5.507
YBR257W	6.897	YPR125W	5.501
YGR039W	6.849	YLR118C	5.468
YPR119W	6.84	YBR094W	5.461
YDR491C	6.485	YMR301C	5.45
YCL056C	6.391	YJR132W	5.408
YBL069W	6.35	YCR097W	5.403
YPR159W	6.313	YPL194W	5.385
YBR071W	6.306	YLR282C	5.366
YBR167C	6.216	YHR140W	5.363

[Table 8]

塩化鉛 (P b C l₂)

遺伝子名	発現量	遺伝子名	発現量
YGR254W	4.601	YBR031W	2.719
YLR359W	3.972	YBR196C	2.68
YDR342C	3.948	YNL178W	2.641
YJL083W	3.58	YPL090C	2.521
YHR096C	3.55	YHR092C	2.488
YOR293W	3.294	YLR081W	2.482
YER102W	3.279	YFR043C	2.472
YPL079W	3.255	YLR110C	2.458
YDR385W	3.253	YDR225W	2.427
YKLO60C	3.118	YFR031B	2.384
YKRO57W	3.096	YDL081C	2.379
YGL103W	3.09	YKL181W	2.359
YDR343C	3.067	YDR345C	2.322
YHL015W	3.053	YHR011W	2.317
YJRO09C	3.043	YBR181C	2.277
YBR191W	3.035	YOL056W	2.219
YDL089W	2.991	YJL116C	2.201
YGL135W	2.877	YBR221C	2.199
YKLO97W	2.842	YNL055C	2.179
YILO20C	2.798	YGL147C	2.173
YHR094C	2.791	YHR203C	2.17
YKLO06W	2.79 1	YER021W	2.125
YLR167W	2.79	YIR012W	2.106
YNL302C	2.771	YOR369C	2.092
YPL081W	2.729	YFL014W	2.083

[0024] Moreover, the graph which patternized the numeric value of Tables 1-8 is shown in drawing 1 - drawing 8 . The gene shown on the axis of ordinate in Table 9 is arranged in the order, and the straight line supports each amount of gene expression. If eight kinds of chemicals are compared, it turns out that the gene expression patterns guided completely differ so that clearly. The pattern of the gene guided can be concluded if the toxic difference in a chemical is reflected.

[0025]

[Effect of the Invention] According to this invention explained to the detail above, even if it is what kind of chemical is contained and the liquid which is not known, the toxicity can presume easily and understands the data from which gene it is. Even if this is the strange new matter, it is completely possible.

[0026] Furthermore, toxicity can identify the chemical independently by comparing with the memorized manifestation pattern.

[Translation done.]

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 2001-286281

(43)Date of publication of application : 16.10.2001

(51)Int.Cl.

C12N 15/09
C12N 1/16
C12Q 1/68
G01N 33/53
G01N 33/566
G01N 33/569
// (C12N 15/09
C12R 1:645)
(C12N 1/16
C12R 1:645)
(C12Q 1/68
C12R 1:645)

(21)Application number : 2000-105907

(71)Applicant : NATL INST OF ADVANCED
INDUSTRIAL SCIENCE &
TECHNOLOGY METI
TERAMETSUKUSU KK

(22)Date of filing : 07.04.2000

(72)Inventor : IWAHASHI HITOSHI
MOMOSE YUKO
KAWAI SHOJI
MATSUMOTO MASAMITSU

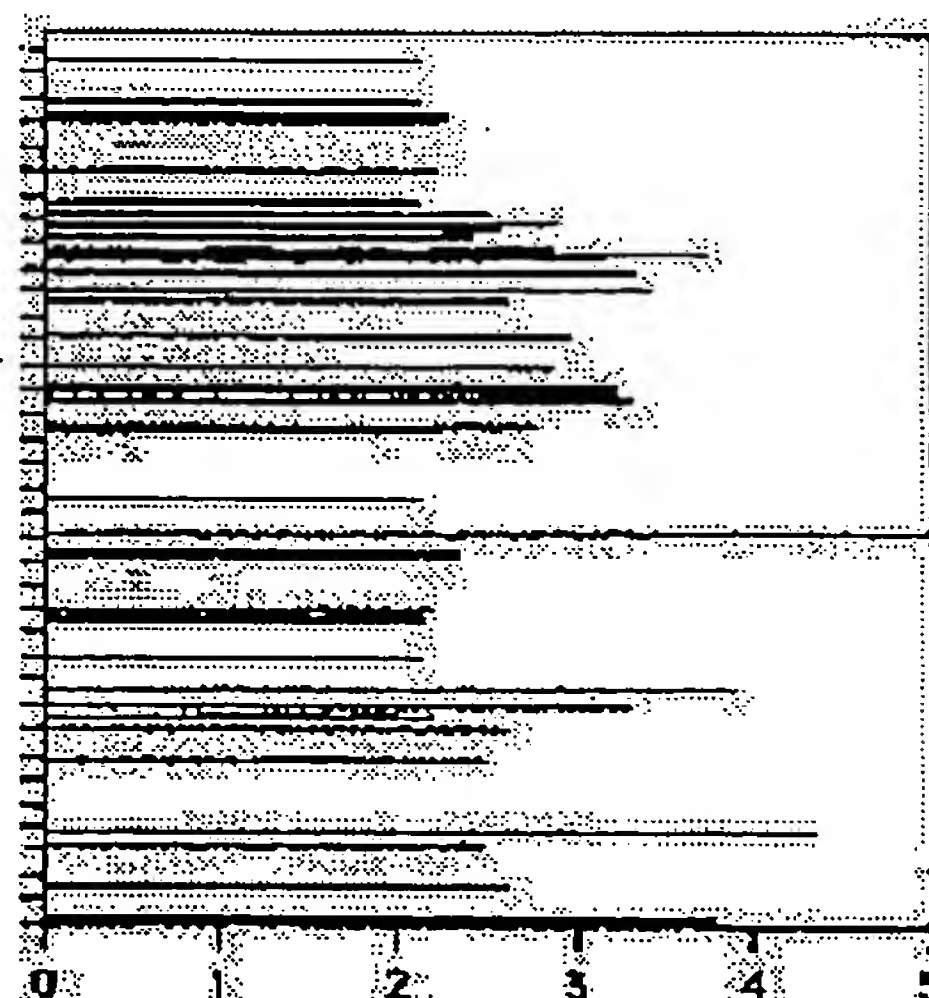
(54) METHOD FOR ASSESSING TOXICITY OF AND METHOD FOR IDENTIFYING CHEMICAL
SUBSTANCE

(57)Abstract:

PROBLEM TO BE SOLVED: To provide the subject two methods having resolved such a problem that, conventional bioassays rely on cell growth inhibition or specific biological reaction as index, resulting in limited amount of information to be obtained; in such a bioassay system, although the presence/absence of toxicity due to chemical substance(s) in the environment can be assessed, neither information concerning such toxicity's characteristics nor information for judging what kind of chemical substance(s) has(have) caused the toxicity is available.

SOLUTION: The two methods, i.e., a method for assessing the toxicity of and a method for identifying chemical substance(s) in question, comprise culturing cells in the presence of chemical substance(s) to be assessed and simultaneously observing the expressed state for the genes in the above cells.

塩化カドミウム(0.33mM)



LEGAL STATUS

[Date of request for examination]

09.01.2003

[Date of sending the examiner's decision of

rejection]

[Kind of final disposal of application other than
the examiner's decision of rejection or application
converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number]

[Date of registration]

[Number of appeal against examiner's decision of
rejection]

[Date of requesting appeal against examiner's
decision of rejection]

[Date of extinction of right]

Copyright (C); 1998,2003 Japan Patent Office

(19)日本国特許庁(JP)

(12)公開特許公報(A)

(11)特許出願公開番号
特開2001-286281
(P2001-286281A)

(43)公開日 平成13年10月16日(2001.10.16)

(51)Int.Cl. ⁷	識別記号	F I	テームト(参考)
C 1 2 N 15/09		C 1 2 N 1/16	A 4 B 0 2 4
1/16		C 1 2 Q 1/68	A 4 B 0 6 3
C 1 2 Q 1/68		G 0 1 N 33/53	M 4 B 0 6 5
G 0 1 N 33/53		33/566	
33/566		33/569	Z
審査請求 未請求 請求項の数12 O L (全 12 頁) 最終頁に続く			

(21)出願番号 特願2000-105907(P2000-105907)

(22)出願日 平成12年4月7日(2000.4.7)

(71)出願人 301000011

経済産業省産業技術総合研究所長
東京都千代田区霞が関1丁目3番1号

(74)上記1名の復代理人 100080724

弁理士 永田 久喜

(71)出願人 591029518

テラメックス株式会社
大阪府大阪市阿倍野区阪南町7丁目2番10号

(74)上記1名の代理人 100080724

弁理士 永田 久喜

最終頁に続く

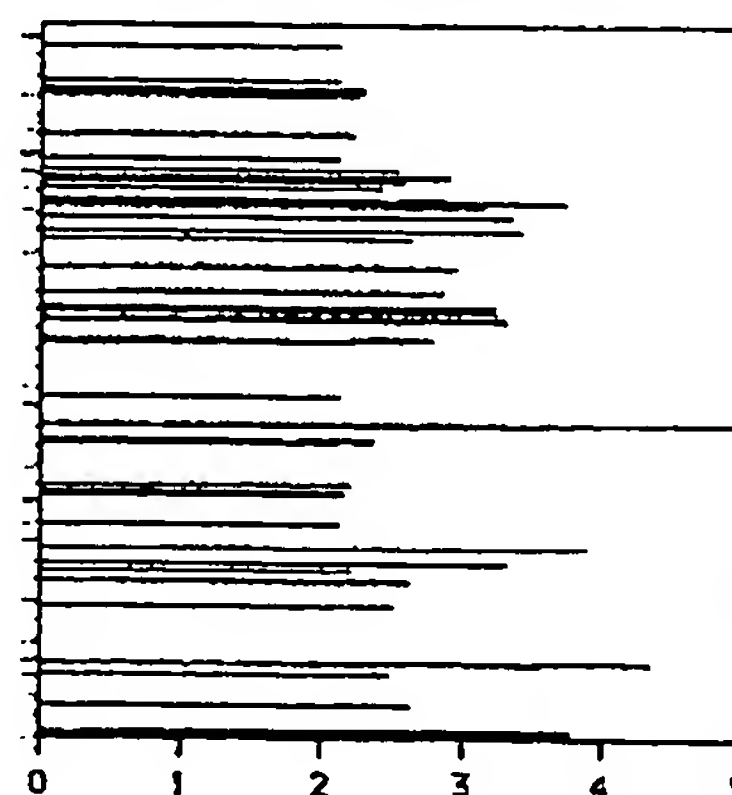
(54)【発明の名称】 化学物質の毒性評価方法及び同定方法

(57)【要約】

【課題】 従来のバイオアッセイは主として細胞の生育阻害や特定の生体反応を指標としておりその情報量が限られている。このようなバイオアッセイ系では環境中の化学物質による毒性の有無は評価できるが、その毒性の性質やどのような化学物質に起因する毒性であるかを判断するための情報が得られない。

【解決手段】 化学物質の毒性評価方法及び同定方法であって、評価すべき化学物質の存在下で細胞を培養し、該細胞の複数の遺伝子の発現状態を同時に観察するもの。

塩化カドミウム(0.33mM)



【特許請求の範囲】

【請求項1】 評価すべき化学物質の存在下で細胞を培養し、該細胞の複数の遺伝子の発現状態を同時に観察することを特徴とする化学物質の毒性評価方法。

【請求項2】 該遺伝子の内少なくとも1つが表9で規定される遺伝子群或いはこれと相同な遺伝子群から選ばれたものである請求項1記載の化学物質の毒性評価方法。

【請求項3】 DNAマイクロアレイ又はマクロアレイを用いるものである請求項2記載の化学物質の毒性評価方法。

【請求項4】 該細胞が、微生物である請求項1、2又は3記載の化学物質の毒性評価方法。

【請求項5】 該微生物が酵母である請求項4記載の化学物質の毒性評価方法。

【請求項6】 該発現状態の評価は、該化学物質の存在下での培養と同じ条件で該化学物質の存在しない状態で細胞を培養し、該化学物質の存在下での培養時の遺伝子からの相補的DNA (cDNA) と、存在しない状態での遺伝子からのcDNAの両方を同一のDNAチップに適用し、その競争反応によるハイブリダイゼーションの差を検出することによって行うものである請求項3、4又は5記載の化学物質の毒性評価方法。

【請求項7】 既知の化学物質の存在下で細胞を培養し、該細胞の遺伝子の発現状態を標準パターンとして記憶し、被測定液の存在下で同様の細胞を培養し、そのときの遺伝子の発現状態を標準パターンと比較することによって、被測定液中の物質を同定することを特徴とする化学物質の同定方法。

【請求項8】 該遺伝子の内少なくとも1つが表9で規定される遺伝子群或いはこれと相同な遺伝子群から選ばれたものである請求項7記載の化学物質の同定方法。

【請求項9】 DNAマイクロアレイ又はマクロアレイを用いるものである請求項8記載の化学物質の同定方法。

【請求項10】 該細胞が、微生物である請求項7、8又は9記載の化学物質の同定方法。

【請求項11】 該微生物が酵母である請求項10記載の化学物質の同定方法。

【請求項12】 該発現状態の評価は、該化学物質の存在下での培養と同じ条件で該化学物質の存在しない状態で細胞を培養し、該化学物質の存在下での培養時の遺伝子からの相補的DNA (cDNA) と、存在しない状態での遺伝子からのcDNAの両方を同一のDNAチップに適用し、その競争反応によるハイブリダイゼーションの差を検出することによって行うものである請求項9、10又は11記載の化学物質の同定方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】 本発明は、化学物質の毒性評

価法及び同定法に関するものである。

【0002】

【従来の技術】 現在、化学物質のデータベース Chemical abstractには約1700万件の化学物質が登録されている。そのうち、1万種類以上の合成化学物質が環境中に蓄積しているものと推定され、その数は年々増加している。合成物質の中には、直接又は環境中で形を変えた後に生態や人体に悪影響を与える物質も含まれている。そのため、それぞれの化学物質について、生態や人体に与える影響を迅速に評価する必要がある。また、環境汚染問題が国民の不安をあおるような社会問題となっている状況の下、種々の高度な測定システムで、環境中に存在する化学物質を同定しようとする試みがなされている。

【0003】 さらに、多くの機関でバイオアッセイを用いた簡易毒性評価試験による毒性の指標化がなされている。これは、動植物細胞や微生物を用いて「化学物質による生物学的応答の変化」を測定し、「毒性」を評価するものである。

【0004】

【発明が解決しようとする課題】 しかしながら、どのような高度な技術を用いても、現状では約10%の化学物質を同定できるにすぎないと言われている。従って、環境中に存在する化学物質を簡単に同定する方法が要望されていた。さらに、従来のバイオアッセイは主として細胞の生育阻害や特定の生体反応を指標としておりその情報量が限られている。このようなバイオアッセイ系では、環境中の化学物質による毒性の有無は評価できるが、その毒性の性質やどのような化学物質に起因する毒性であるかを判断するための情報がまったく得られない。

【0005】

【課題を解決するための手段】 以上のような現状に鑑み本発明者は鋭意研究の結果本発明を完成させたものであり、その特徴とするところは、化学物質の毒性評価法においては、評価すべき化学物質の存在下で細胞を培養し、該細胞の複数の遺伝子の発現状態を同時に観察、評価する点にあり、化学物質の同定方法にあっては、既知の化学物質の存在下で細胞を培養し、該細胞の遺伝子の発現状態を標準パターンとして記憶し、被測定液の存在下で同様の細胞を培養し、そのときの遺伝子の発現状態を標準パターンと比較することによって、被測定液中の物質を同定する点にある。

【0006】 化学物質は、それぞれ固有の毒性を有しており、生物に影響を与える。影響を受けた生物はその毒性に応じて修復又は解毒機構を働かせる。その例として、ストレス応答と呼ばれるものがある。微生物から高等生物まですべての生物細胞は、環境ストレス（高温、低温、高圧、乾燥、紫外線、薬物暴露等）に曝されると、瞬時にストレス応答タンパク（HSP）を合成し、

これらの環境に耐える体制を整える。これをストレス応答という。即ち、ストレス応答タンパク産生遺伝子は、生体が環境の影響を受けた時のみ、しかもストレスの種類に応じたタンパクを、受けたストレスの程度に応じて産生する。還元すれば、生体はストレスの種類と程度に応じてストレス応答タンパク産生遺伝子を発現している事となる。即ち、生体が化学物質から受けた毒性の影響からの修復機構や解毒機構の誘導によってもたらされる特定の遺伝子の発現を検出することによって、その化学物質の毒性を評価することが可能になるのである。

【0007】化学物質の影響は単に1つの遺伝子の発現をもたらすものではなく、常に複数の遺伝子が毒性に応答して発現する。また、発現する遺伝子の種類、発現パターンは化学物質によって異なる。本発明はこのことを利用して未知化学物質の種類と毒性の程度を同定することができる。即ち、該未知化学物質が特徴的に誘導する遺伝子群と、既知の化学物質を用いて誘導される遺伝子群のスペクトル（パターン）を比較することで、その化学物質を推定することができる。また、その誘導される遺伝子群から未知化学物質がどの程度の危険性があるかを推定することができる。

【0008】評価すべき化学物質とは、被検液に含まれる化学物質であり、それが何か分かっている必要はなく、また単数か複数かもわかっていなくともよい。よって、ここでいう評価すべき化学物質の存在下というのは、その化学物質が含まれている被検液の存在下という意味である。

【0009】ここでいう化学物質とは、硫酸銅、塩化水銀、重クロム酸カリウム、塩化鉛、塩化ニッケル、塩化カドミウムなどの無機金属化合物、塩化トリブチル錫、メチル水銀、四メチル鉛などの有機金属化合物、ジクロロエタン、ダイオキシン類などの有機塩素化合物、ビスフェノールA、フタル酸ジメチルなどの有機化合物、スルファニルウレア、有機リン化合物、カーバメート剤などの農薬、ドデシルベンゼンスルホン酸ナトリウムなどの界面活性剤、メタノールなどのアルコール類などがあげられるが、これらに限定するものではなく少なくとも生理活性を持つ化学物質であればよい。

【0010】また、本発明は新規化学物質の毒性も評価できる。新規化学物質について誘導される遺伝子群を測定しその発現パターンを記憶しておけば、未知試料中の当該化学物質の存在が確認できる。このとき化学物質の組成や構造が分かっている必要はない。また、その発現遺伝子を詳細に検討することで、その毒性を評価することができる。例えば、実施例1で示すように、カドミウムで誘導される遺伝子群からは、少なくともグルタチオン、システイン、メチオニンの欠乏が起こることが推定できるが、新規化学物質においてこれらの遺伝子が発現していれば、その物質がカドミウム類似の毒性を持つこ

とが評価できる。

【0011】細胞としては、ヒト細胞が好ましいのは当然であるが、マウスその他の細胞でもよい。更に、培養が容易であること、遺伝子の機能がよく研究されていることから細胞として微生物を用いることも好適である。また、微生物の中でも酵母が好適であった。これは、取り扱いが容易であるうえ、ヒト進化の過程にある生物と考えられ、ヒトに対する毒性等と同じように機能する遺伝子が多いと考えられているためである。

【0012】培養方法は、用いる細胞の通常の培養方法でよく特別な方法である必要はない。YPD培地やその他の培地でよい。

【0013】遺伝子の発現状態を観察、評価する手段としては、ノーザンブロットやRT-PCRを複数行う等、遺伝子の発現量が測定できる方法であればどのような方法でもよい。しかし、DNAマイクロアレイ又はマクロアレイを用いる方法が好適である。DNAマイクロアレイとは、スライドガラスのような小さなチップ上（25mm×75mm程度）に数10から数千個程度、或いは数万個のcDNA（相補的なDNA）を貼りつけたものである。これに対してマクロアレイとは、比較的大きな濾紙状の担体（10cm×10cm程度）に、同様に数十から数千個程度のcDNAを貼りつけたものである。

【0014】試料から発現しているDNA或いはRNAを取りだし、必要によりPCRなどを用いて適当に増幅し、アレイに添加（適用）する。温度を適当に調整することで、試料中のDNAとアレイ上のcDNAをハイブリダイズさせる。ハイブリダイズしたDNAの検出は通常蛍光色素などのマーカーを用いて検出するが、マーカーを用いず、表面プラズモン共鳴や、偏光解消或いはエバネッセント光などを用いた検出法を用いることもできる。

【0015】上記の観察方法では、試料を単独で検出しているが、化学物質（これを含む試料液）を添加しないこと以外は試料と同じ条件で培養した対照区（ブランク検体）も作成し、それと試料検体とを一緒にDNAアレイに適用し、ハイブリダイゼーションを競争的に起こさせ、同一遺伝子における試料とブランク検体のハイブリダイズ量の違いを観察してもよい。

【0016】アレイに添着しておくDNAは目的とする化学物質を識別するのに必要なだけでよい。例えば、酵母ではおよそ6000個の遺伝子があると言われるが、化学物質に応答して特異的に発現量が変化する遺伝子は高々500個程度であると推定される。表9に毒物に応答して発現する遺伝子の一部を列挙した。これらの遺伝子だけで、少なくとも実施例に示した8種類の化合物の判定が可能であるが、化合物はこれらに限定されるものではない。

【表9】

発現する遺伝子の一部

YAL012W	YCR021C	YER103W	YHL015W	YJR047C	YLR231C	YNL178W	YOR259C
YAL019W	YCR031C	YER138C	YHL023C	YJR132W	YLR257W	YNL190W	YOR266W
YAL067C	YCR062N	YER150W	YHR019C	YJR166W	YLR270W	YNL191W	YOR293W
YAR002W	YCR085W	YFL014W	YHR053C	YJR157W	YLR280C	YNL208W	YOR303W
YAR007C	YCR096C	YFL057C	YHR055C	YKL001C	YLR282C	YNL209W	YOR306C
YAR043C	YCR097W	YFR016C	YHR056C	YKL006W	YLR286C	YNL214W	YOR310C
YBL006C	YDL061C	YFR022W	YHR073W	YKL026C	YLR300W	YNL239W	YOR338W
YBL046W	YDL078C	YFR031BC	YHR087W	YKL060C	YLR303W	YNL277W	YOR355W
YBL069W	YDL081C	YFR043C	YHR092C	YKL071W	YLR327C	YNL281W	YOR369C
YBL073W	YDL089W	YFR049W	YHR094C	YKL097W	YLR337W	YNL302C	YOR371C
YBL077W	YDL109C	YFR052W	YHR096C	YKL136W	YLR340W	YNL307C	YOR375C
YBR012W	YDL181W	YGL014W	YHR104W	YKL143W	YLR354C	YNL331C	YOR382W
YBR027C	YDL204W	YGL030W	YHR138C	YKL181W	YLR359W	YNL334C	YPL028W
YBR031W	YDR032C	YGL037C	YHR140W	YKL200C	YLR367W	YNR001C	YPL037C
YBR071W	YDR033W	YGL053W	YHR174W	YKL214C	YLR388W	YNR021W	YPL053C
YBR072W	YDR069C	YGL055W	YHR203C	YKL217W	YML004C	YNR030W	YPL079W
YBR077C	YDR070C	YGL103W	YIL010W	YKR032W	YML102W	YOL006C	YPL081W
YBR078W	YDR077W	YGL116W	YIL020C	YKR039W	YML106W	YOL016C	YPL090C
YBR082C	YDR154C	YGL121C	YIL021W	YKR042W	YMR009W	YOL038W	YPL106C
YBR094W	YDR223W	YGL135W	YIL074W	YKR051W	YMR011W	YOL044W	YPL147W
YBR149W	YDR225W	YGL138C	YIL082W	YKR057W	YMR015C	YOL049W	YPL149W
YBR163W	YDR227W	YGL146C	YIL090W	YKR059W	YMR052W	YOL053C	YPL194W
YBR162C	YDR336W	YGL147C	YIL100W	YKR080W	YMR058W	YOL056W	YPL201C
YBR167C	YDR342C	YGL239C	YIL106W	YKR094C	YMR107W	YOL086C	YPL221W
YBR169C	YDR343C	YGL240W	YIL111W	YLL024C	YMR167W	YOL127W	YPL239W
YBR173C	YDR345C	YGR008C	YIL136W	YLL039C	YMR173W	YOL141W	YPL250C
YBR181C	YDR385W	YGR039W	YIL144W	YLL058W	YMR215W	YOL161W	YPR006C
YBR191W	YDR443C	YGR040W	YIR012W	YLR029C	YMR243C	YOL164W	YPR023C
YBR196C	YDR453C	YGR043C	YJL082W	YLR056W	YMR275C	YORJ007C	YPR082C
YBR207W	YDR475C	YGR087C	YJL083W	YLR058C	YMR301C	YOR019W	YPR099C
YBR221C	YDR491C	YGR088W	YJL110C	YLR081W	YMR307W	YOR020C	YPR119W
YBR236C	YDR633C	YGR103W	YJL116C	YLR092W	YMR318C	YOR027W	YPR126W
YBR257W	YEL006W	YGR142W	YJL144W	YLR110C	YNL015W	YOR081C	YPR159W
YBR263W	YER012W	YGR154C	YJL161C	YLR118C	YNL055C	YOR088W	YPR165W
YBR296C	YER021W	YGR163W	YJL168C	YLR134W	YNL066W	YOR128C	YPR167C
YCL025C	YER042W	YGR205W	YJL169W	YLR153C	YNL069C	YOR136W	YPR188C
YCL043C	YER046W	YGR224W	YJL160C	YLR157C	YNL134C	YOR152C	YPR204W
YCL056C	YER067W	YGR236C	YJL177W	YLR167W	YNL135C	YOR184W	
YCLX11W	YER072W	YGR246C	YJR009C	YLR178C	YNL142W	YOR187W	
YCR004C	YER074W	YGR253C	YJR010W	YLR205C	YNL143C	YOR221C	
YCR012W	YER091C	YGR254W	YJR025C	YLR214W	YNL160W	YOR240W	
YCR013C	YER102W	YGR275W	YJR029W	YLR216C	YNL169C	YOR253W	

【0017】これらの8種のように特定の化学物質を選択しそれらによって発現する遺伝子の発現量の上位所定数の遺伝子のみ測定して評価してもよい。例えば、上位50個の遺伝子のみ測定する等である。このようにすると、測定が簡単になる。

【0018】次に本発明の化学物質同定法について説明する。まず、既知の化学物質（単一が好ましい）を含有する試料を培養し、発現した遺伝子名と発現強度をその化合物の標準として記録しておく。このときこれらをグラフ化してパターンとして記憶しておく視覚的にも判断できる。勿論、コンピューターに記録しそこで判定してもよい。

【0019】このとき、被検液中に複数の化学物質が含まれている場合、遺伝子の発現パターンはその含まれている化学物質のそれぞれの発現パターンの単純合計になることがわかった。よって、特徴的な遺伝子の発現量から容易にその複数の化学物質を推定することができる。

勿論、この場合には未知化学物質は同定できない。よって、いかに多くの既知化学物質の発現パターンを記録、保存しておくかが同定できる化学物質の多さを決めることとなる。しかし、その遺伝子自体の意味や機能がわかっている必要はない。

【0020】

【実施例】以下実施例に沿って具体的に発明を詳細に説明するが、本発明がこれらに限定されるものではない。

実施例1

YPD培地（酵母エキス1%、ポリペプトン2%、ブドウ糖2%）を用いて酵母を培養した。対数増加期に化学物質として塩化カドミウム（ CdCl_2 、0.33mM）を添加し2時間培養した。これとまったく同じ条件で化学物質を添加せず培養したものを対照区とした。この試料及び対照区を同量DNAチップ（DNAチップ研究所製）に滴下し、65℃で、1晩又は12時間以上ハイブリダイズさせた。DNAチップをスキャナー（SC

AN・ARRAY4000: GSIルミコス)により発現遺伝子と発現量を測定した。それを表10に示す。全ての遺伝子について、記述することも可能であるが、ここでは化学物質の毒性によって応答した遺伝子を対象としているため、それぞれのモデル化学物質について発現量の多い上位50の遺伝子だけを機械的に選択して示した。ここでの数値は、対照区に対する相対量で示している。即ち、数値が1の場合には、試料と対照区が同量であり、化学物質によって特別に発現していないということである。この比較の方法は異なる色に発色(蛍光)するようにしておき、その色を測定して行ってもよい。

【0021】勿論、同一のDNAチップに適用して競争させず、別のDNAチップに適用してその差を測定して

もよい。

【0022】この表10及び11は、塩化カドミウムによって誘導される遺伝子の役割(機能)も記述した。誘導される遺伝子群の特徴として、硫黄の代謝系酵素群を挙げることができる。このことは、カドミウムの添加により、酵母の細胞内で硫黄代謝の異常が生じたことを示している。また、アミノ酸細胞内取りこみ関連の遺伝子が誘導されている。硫黄代謝の最終生産物が、グルタチオン、システイン、メチオニンであることを考えると、酵母細胞内で起こった異常は、これら含硫アミノ酸の欠乏であると結論することができる。

【表10】

カドミウムによって誘導される遺伝子-1		
遺伝子名	発現強度	遺伝子の機能 (unは未知の遺伝子)
YLR303W	16.52826667	O-Acetylhomoserine-O-Acetyl serine Sulfhydrylase
YEL001C	10.95636	adenylylsulfate kinase
YOL164W	7.11974	un (unknown)
YIL074W	5.452856667	
YBR295C	4.361473333	Probable Nat/Pi symporter
YFL057C	3.90936	very similar to A55449 aryl-alcohol dehydrogenase
YAL067C	3.76404	Suppressor of Sulfoxide Ethionine resistance
YNL142W	3.74786	Ammonia transport protein
YCL025C	3.471056667	Amino acid permease
YMR173W	3.415143383	DNA damage inducible;
YMR318C	3.35437	un
YER074W	3.333333333	40S ribosomal protein S24A
YLL058W	3.296736667	un
YLR092W	3.217813333	high affinity sulfate permease
YNL134C	3.160216667	un
YKL217W	3.097286667	essential for lactate uptake in yeast
YOR382W	3.074303333	un
YLR327C	2.93819	un
YNL277W	2.900126667	homoserine O-trans-acetylase
YNL160W	2.871143333	may be involved in cellular adaptations prior to stationary
YLR205C	2.838356667	un
YER039W	2.76581	general amino acid permease
YDR533C	2.632056667	un
YBR072W	2.615956667	heat shock protein 26
YMR058W	2.613936667	high-affinity iron transport system
YNL239W	2.581933333	aminopeptidase of cysteine protease family

【表11】

カドミウムによって誘導される遺伝子-2

遺伝子名	発現強度	遺伝子の機能 (unは未知の遺伝子)
YNL331C	2.513673333	Hypothetical aryl-alcohol dehydrogenase
YDR223W	2.50132	un
YBR207W	2.481336667	
YNL191W	2.430063333	un
YAL012W	2.408388333	cystathionine gamma-lyase
YHR138C	2.345876667	un
YFL014W	2.303206667	12 kDa heat shock protein
YOR253W	2.287533333	un
YOR338W	2.28119	un
YOR303W	2.26205	Carbamoyl phosphate synthetase, arginine specific
YOR306C	2.242523333	un
YKR032W	2.22148	un
YOR007C	2.22148	small glutamine-rich tetratricopeptide repeat containing protein
YPR204W	2.192553333	un
YER046W	2.189143333	un
YGR154C	2.187783383	un
YGR087C	2.157476667	un
YNL208W	2.149786667	un
YJL151C	2.13153	un
YOR375C	2.13153	NADP-specific glutamate dehydrogenase
YOL006C	2.121983333	topoisomerase I
YGR103W	2.116846667	un
YGL055W	2.116823333	delta-9 fatty acid desaturase
YPR023C	2.11356	un

【0023】次に種々の化学物質に対して、同様の実験を行った。その遺伝子名と発現量を表に示す。化学物質としては、メチル水銀 (CH_3HgCl)、塩化水銀 (HgCl_2)、トリブチルチンクロライド ($(\text{C}_4\text{H}_9)_3\text{SnCl}$)、重クロム酸カリウム ($\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$)、塩化ニッケル (NiCl_2)、硫酸銅 ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$)、塩化鉛 (PbCl_2) である。これらの物質に加えて、前記塩化カドミウムも含めて表1～8に示す。誘導される遺伝子 (上位50に限り) 全てをアルファベット順に示した。表1～8に示された遺伝子は400種類であるが、重複する遺伝子があるため、合計331種類であり、これを表9に羅列した。

【表1】

塩化カドミウム (CdCl₂)

遺伝子名	発現量	遺伝子名	発現量
YLR303W	16.53	YNL239W	2.582
YKL001C	10.96	YNL331C	2.514
YOL164W	7.12	YDR223W	2.501
YIL074W	5.453	YBR207W	2.481
YBR296C	4.361	YNL191W	2.43
YFL057C	3.909	YAL012W	2.408
YAL067C	3.764	YHR138C	2.346
YNL142W	3.748	YFL014W	2.303
YCL025C	3.471	YOR253W	2.288
YMR173W	3.415	YOR338W	2.281
YMR318C	3.354	YOR303W	2.262
YER074W	3.333	YOR306C	2.243
YLL058W	3.297	TKR032W	2.221
YLR092W	3.218	YOR007C	2.221
YNL134C	3.16	YPR204W	2.193
YKL217W	3.097	YER046W	2.189
YOR382W	3.074	YGR154C	2.188
YLR327C	2.938	YGR087C	2.157
YNL277W	2.9	YNL208W	2.15
YNL160W	2.871	YJL151C	2.132
YLR205C	2.838	YOR375C	2.132
YKR039W	2.766	YOL006C	2.122
YDR533C	2.632	YGR103W	2.117
YBR072W	2.616	YGL055W	2.117
YMR058W	2.614	YPR023C	2.114

【表2】

メチル水銀 (CH₃HgCl)

遺伝子名	発現量	遺伝子名	発現量
YLR214W	5.327	YJR157W	2.127
YJR009C	4.656	YOR136W	2.08
YLR286C	3.95	YNL066W	2.071
YCR013C	3.401	YLR354C	2.061
YMR307W	2.951	YOR187W	2.027
YLR300W	2.782	YOR128C	1.993
YLR359W	2.746	YJL159W	1.992
YMR058W	2.694	YBR031W	1.989
YOR184W	2.693	YLR340W	1.986
YPL028W	2.663	YLR056W	1.978
YMR015C	2.647	YDR033W	1.966
YOL086C	2.552	YJR047C	1.922
YBR078W	2.541	YOR355W	1.916
YNL069C	2.484	YCL043C	1.884
YNL190W	2.435	YLR058C	1.872
YKR080W	2.411	YJL062W	1.858
YLR303W	2.387	YLR153C	1.793
YHR019C	2.364	YNL106W	1.793
YLL024C	2.277	YDL109C	1.786
YMR243C	2.233	YCR012W	1.707
YHR174W	2.215	YMR215W	1.697
YLR029C	2.163	YNL307C	1.695
YBR162C	2.159	YMR021W	1.677
YNL209W	2.135	YLR231C	1.675
YPL037C	2.135	YJL158C	1.675

【表3】

塩化水銀 (HgCl₂)

遺伝子名	発現量	遺伝子名	発現量
YJR010W	4.993	YDR032C	2.602
YER091C	4.667	YBR149W	2.514
YMR052W	3.935	YCR013C	2.511
YHR087W	3.688	YGL138C	2.479
YNL160W	3.439	YGL116W	2.454
YOL141W	3.427	YKR051W	2.419
YPR167C	3.364	YKL200C	2.416
YER103W	3.318	YLL024C	2.399
YCLX11W	3.315	YGL037C	2.384
YNL134C	3.289	YER150W	2.383
YFL014W	3.288	YBR169C	2.38
YGR142W	3.157	YMR173W	2.341
YJL160C	3.087	YBR082C	2.303
YLR216C	3.055	YML004C	2.288
YCR012W	3.047	YKL071W	2.288
YGL146C	2.975	YHR056C	2.27
YDR227W	2.9	YLR178C	2.269
YOL151W	2.885	YPL106C	2.261
YNL015W	2.875	YNL281W	2.237
YGR040W	2.748	YLR303W	2.224
YDL204W	2.719	YPL250C	2.21
YOR027W	2.714	YLR270W	2.167
YGR043C	2.654	YGR088W	2.157
YER042W	2.621	YHR104W	2.15
YDR453C	2.603	YML102W	2.145

【表4】

トリブチルチンクロライド ((C₄H₉)₃SnCl)

遺伝子名	発現量	遺伝子名	発現量
YKL214C	3.886	YOL053C	1.674
YGR253C	3.434	YKL026C	1.669
YLR327C	3.105	YHR087W	1.66
YIL111N	3.062	YGR275W	1.654
YDR070C	2.918	YJR155W	1.647
YDR533C	2.672	YOR027W	1.644
YFL014N	2.64	YER012W	1.64
YMR030N	2.479	YDR475C	1.639
YGR163N	2.329	YOR019W	1.601
YFL057C	2.328	YPR052W	1.601
YGL121C	2.31	YOR338W	1.597
YKL134C	2.087	YMR138C	1.597
YOR020C	2.039	YCR062W	1.567
YGL053N	2.027	YLR157C	1.564
YMR088W	1.965	YGR236C	1.554
YER150W	1.909	YMR107W	1.554
YOL038N	1.833	YGR224W	1.545
YOR152C	1.827	YGR205W	1.538
YGR008C	1.797	YBR236C	1.534
YOR259C	1.764	YPL053C	1.527
YNL160W	1.728	YCR096C	1.524
YIL144N	1.718	YMR009W	1.513
YPL149W	1.702	YMR167W	1.511
YKL136N	1.687	YIL136W	1.51
YJL114N	1.685	YBR173C	1.507

【表5】

重クロム酸カリウム ($K_2Cr_2O_7$)

遺伝子名	発現量	遺伝子名	発現量
YOR081C	25.25	YDE335W	0.998
YLB337W	5.79	YNL135C	0.994
YJR009C	2.758	YFR016C	0.984
YDR032C	2.679	YOL044W	0.978
YMR275C	2.528	YFR022W	0.962
YOR371C	1.993	YKL143W	0.957
YAR007C	1.641	YLB340W	0.954
YOR221C	1.584	YDL181W	0.95
YJL159W	1.396	YOL049W	0.94
YCR013C	1.383	YDL061C	0.933
YGL030W	1.308	YOR240W	0.929
YBL006C	1.308	YJL177W	0.923
YLB388W	1.291	YLR214W	0.921
YOL086C	1.261	YNL134C	0.907
YLL024C	1.253	YLR134W	0.899
YPL147W	1.246	YLR303W	0.895
YDR077W	1.206	YOR136W	0.889
YPL221W	1.164	YBR078W	0.883
YDR069C	1.119	YHR073W	0.878
YLR110C	1.118	YJR155W	0.865
YDR154C	1.098	YOR259C	0.856
YAL019W	1.085	YBR027C	0.853
YHR174W	1.053	YNL208W	0.848
YNL178W	1.047	YDR533C	0.844
YCR031C	1.047	YNL143C	0.836

【表6】

塩化ニッケル ($NiCl_2$)

遺伝子名	発現量	遺伝子名	発現量
YAL160W	19.02	YOL016C	7.572
YJR009C	18.78	YOR266W	7.521
YBR012W	15.72	YMR307W	7.453
YHR059W	13.21	YIL090W	7.193
YJR029W	11.61	YOL127W	7.193
YHR058W	11.2	YPL239W	7.105
YPL028W	10.4	YCL043C	6.988
YJR025C	10.05	YEL006W	6.975
YDR077W	10.04	YCR246C	6.892
YHR055C	9.485	YCL025C	6.82
YBR162C	9.369	YLR056W	6.82
YLR354C	9.323	YER067W	6.789
YNL135C	9.206	YBR078W	6.66
YKR094C	9.187	YHL023C	6.578
YJL151C	9.148	YFR049W	6.521
YMR173W	8.996	YLR300W	6.29
YJL159W	8.916	YDL078C	6.29
YGL121C	8.561	YGL030W	6.286
YJL110C	8.319	YLR367W	6.224
YCR021C	8.314	YMR001C	6.221
YLR359W	8.142	YGL135W	6.136
YLL039C	8.024	YGL014W	6.102
YCR013C	7.886	YER138C	6.071
YBR263W	7.696	YKR042W	6.026
YLR257W	7.67	YOR310C	6.01

【表7】

硫酸銅 ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$)

遺伝子名	発現量	遺伝子名	発現量
YHR053C	13.97	YIL106W	6.134
YNL169C	11.98	YPR099C	6.121
YPR082C	9.876	YPR188C	6.076
YPR167C	8.821	YNL214W	6.073
YDR443C	8.642	YBL077W	6.071
YHR055C	8.568	YIL021W	6.036
YPR165W	8.447	YER072W	5.902
YPR006C	8.171	YPL201C	5.779
YIL010W	7.728	YBL073W	5.764
YAR002W	7.721	YBR153W	5.757
YIL082W	7.433	YGL239C	5.645
YGL240W	7.365	YLR280C	5.613
YLL053W	7.265	YCR004C	5.575
YCR085W	7.09	YNL334C	5.553
YIL100W	7.067	YBL046W	5.522
YBR077C	6.986	YAR043C	5.507
YBR257W	6.897	YPR125W	5.501
YGR039W	6.849	YLR118C	5.488
YPR119W	6.84	YBR094W	5.461
YDR491C	6.485	YMR301C	5.45
YCL056C	6.391	YJR132W	5.408
YBL069W	6.35	YCR097W	5.403
YPR159W	6.313	YPL194W	5.385
YBR071W	6.306	YLR282C	5.366
YBR167C	6.216	YHR140W	5.363

塩化鉛 (PbCl_2)

遺伝子名	発現量	遺伝子名	発現量
YGR254W	4.601	YBR031W	2.719
YLR359W	3.972	YBR196C	2.68
YDR342C	3.948	YNL178W	2.641
YJL083W	3.58	YPL090C	2.521
YHR096C	3.55	YHR092C	2.488
YOR293W	3.294	YLR081W	2.482
YER102W	3.279	YPR043C	2.472
YPL079W	3.255	YLR110C	2.458
YDR385W	3.253	YDR225W	2.427
YKL060C	3.118	YPR031B	2.384
YKR057W	3.096	YDL081C	2.379
YGL103W	3.09	YXL181W	2.359
YDR343C	3.067	YDR345C	2.322
YHL015W	3.053	YMR011W	2.317
YJR009C	3.043	YBR181C	2.277
YBR191W	3.035	YOL056W	2.219
YDL089W	2.991	YJL116C	2.201
YGL135W	2.877	YBR221C	2.199
YKL097W	2.842	YNL055C	2.179
YIL020C	2.798	YGL147C	2.173
YHR094C	2.791	YHR203C	2.17
YKL006W	2.791	YER021W	2.125
YLR167W	2.79	YIR012W	2.106
YNL302C	2.771	YOR369C	2.092
YPL081W	2.729	YFL014W	2.083

【表8】

【0024】また、表1～8の数値をパターン化したグラフを図1～図8に示す。縦軸には表9で示した遺伝子とその順に並べており、直線はそれぞれの遺伝子の発現量に対応している。8種類の化学物質を比較すれば明らかのように、誘導される遺伝子の発現パターンはまったく異なることがわかる。誘導される遺伝子のパターンは化学物質の毒性の違いを反映したものであると結論づけることができる。

【0025】

【発明の効果】以上詳細に説明した本発明によれば、どのような化学物質が含まれているか分からない液体であっても、その毒性が簡単に推定でき、またどの遺伝子からのデータであるかもわかる。これは、まったく未知の新規物質であっても可能である。

【0026】さらに、記憶している発現パターンと比較することによって、毒性とは別にその化学物質を同定することができる。

【図面の簡単な説明】

【図1】塩化カドミウム (CdCl_2) を添加したときの遺伝子の発現パターンを示すグラフである。

【図2】メチル水銀 (CH_3HgCl) を添加したときの遺伝子の発現パターンを示すグラフである。

【図3】塩化水銀 (HgCl_2) を添加したときの遺伝子の発現パターンを示すグラフである。

【図4】トリブチルチンクロライド ($(\text{C}_4\text{H}_9)_3\text{SnCl}$) を添加したときの遺伝子の発現パターンを示すグラフである。

【図5】重クロム酸カリウム ($\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$) を添加したときの遺伝子の発現パターンを示すグラフである。

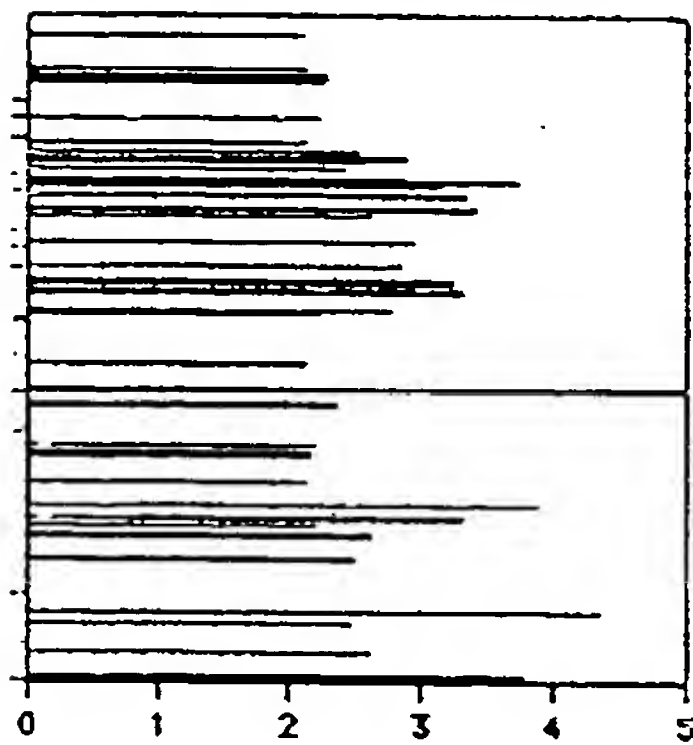
【図6】塩化ニッケル (NiCl_2) を添加したときの遺伝子の発現パターンを示すグラフである。

【図7】硫酸銅 ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) を添加したときの遺伝子の発現パターンを示すグラフである。

【図8】塩化鉛 (PbCl_2) を添加したときの遺伝子の発現パターンを示すグラフである。

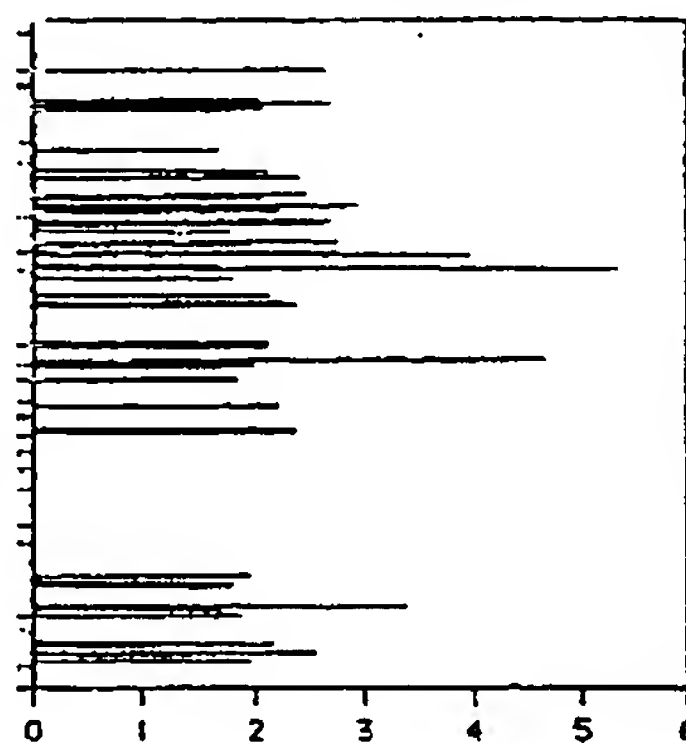
【図1】

塩化カドミウム (0.33mM)



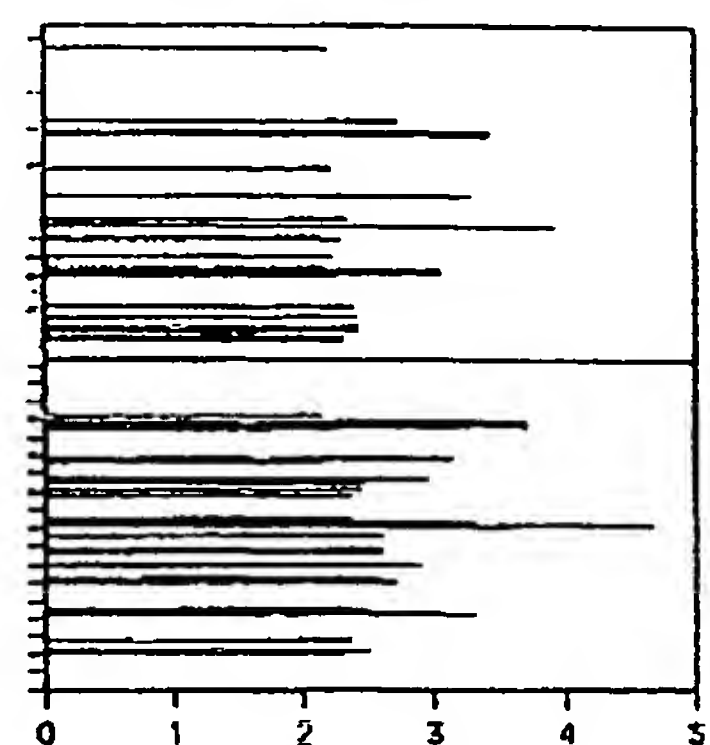
【図2】

メチル水銀 (74μM)



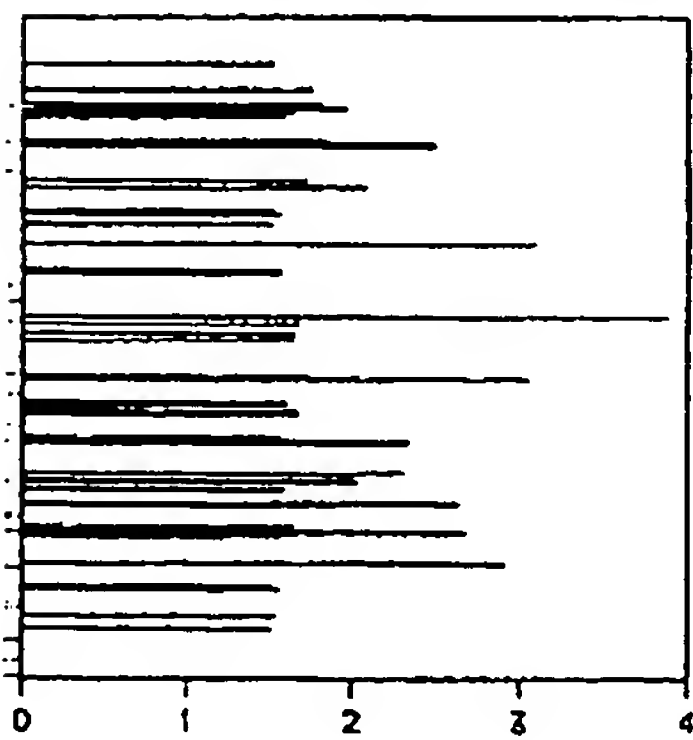
【図3】

塩化水銀 (0.67mM)



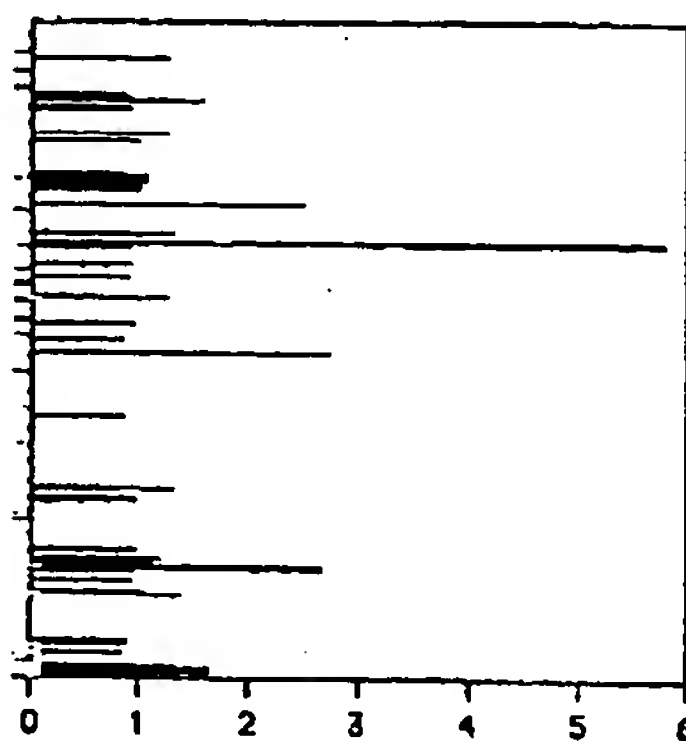
【図4】

トリブチルチンクロライド (14μM)



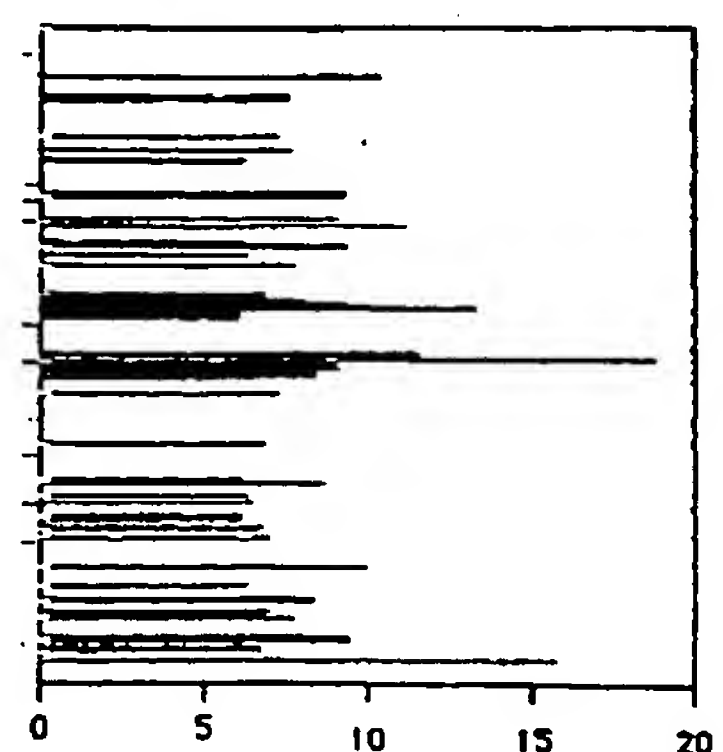
【図5】

重クロム酸カリウム (3.3mM)

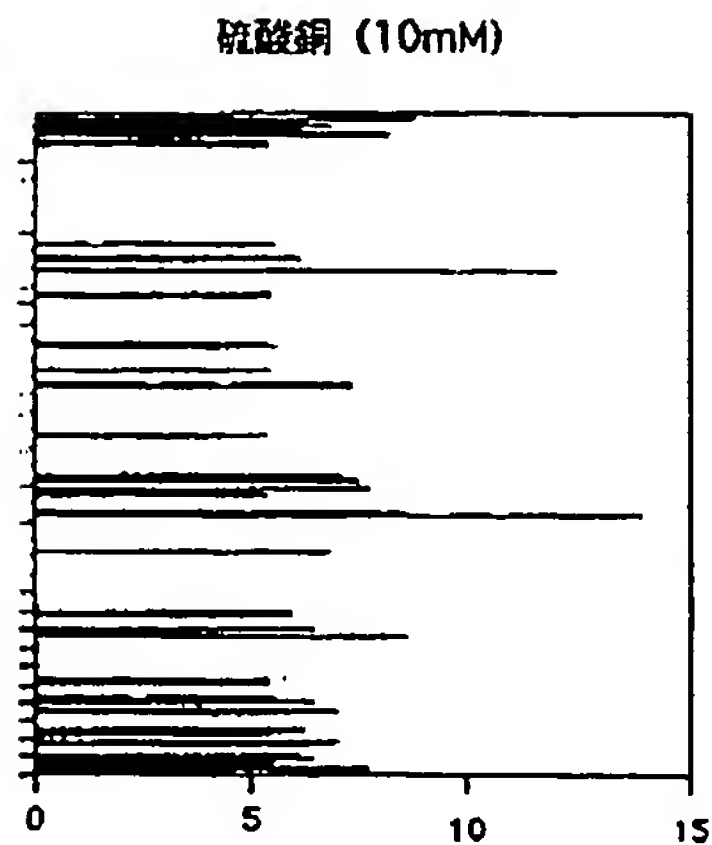


【図6】

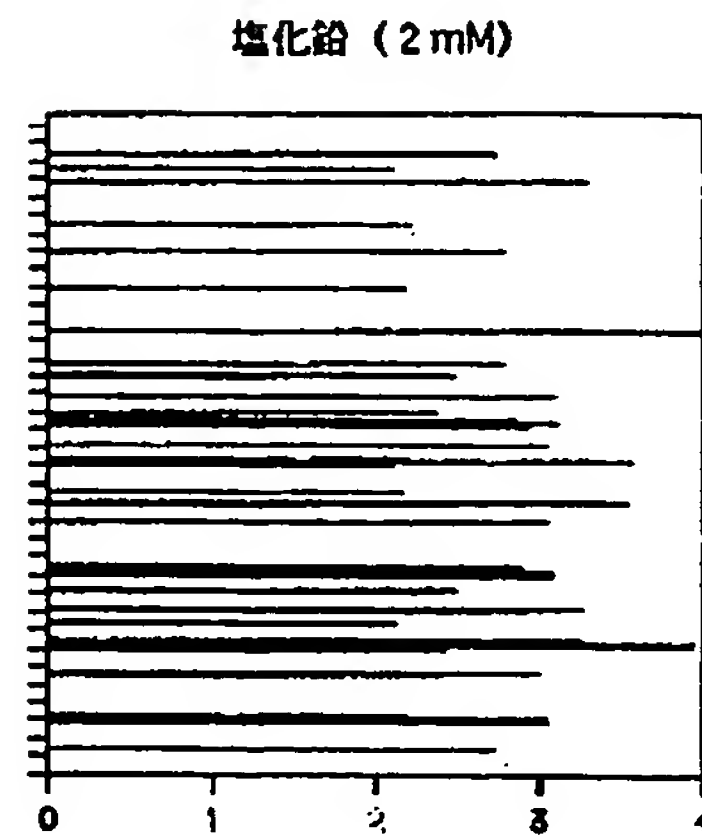
塩化ニッケル (100mM)



【図7】



【図8】



フロントページの続き

(51)Int.Cl.⁷

識別記号

F I

(参考)

G 0 1 N 33/569
/(C 1 2 N 15/09
C 1 2 R 1:645)
(C 1 2 N 1/16
C 1 2 R 1:645)
(C 1 2 Q 1/68
C 1 2 R 1:645)

C 1 2 R 1:645)
(C 1 2 N 1/16
C 1 2 R 1:645)
(C 1 2 Q 1/68
C 1 2 R 1:645)
C 1 2 N 15/00
C 1 2 R 1:645)

A

A

A

(72)発明者 岩橋 均

茨城県つくば市東1丁目1番3 工業技術
院生命工学工業技術研究所内

(72)発明者 松本 雅光

大阪府三島郡島本町山崎4丁目20番5-
909号

(72)発明者 百瀬 祐子

茨城県つくば市東1丁目1番3 工業技術
院生命工学工業技術研究所内

F ターム(参考) 4B024 AA11 CA02 CA09 GA19 HA14

4B063 QA01 QA06 QA18 QQ20 QQ61

QQ89 QR32 QR40 QR55 QR76

QR84 QS34

(72)発明者 河井 昭治

京都府宇治市平尾台2丁目8の4

4B065 AA72X AC20 BB02 BB04

BC12 BC41 BD01 CA46

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ BLACK BORDERS
- ☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☒ FADED TEXT OR DRAWING
- ☐ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☐ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☒ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☐ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.